

УДК 576.893.19 : 595.754

**ОПИСАНИЕ WALLACEINA VICINA SP. N.
(KINETOPLASTIDA: TRYPANOSOMATIDAE)
ИЗ КЛОПА-ВОДОМЕРКИ GERRIS RUFOSCUTELLATUS LATREILLE, 1807
(HEMIPTERA: GERRIDAE)**

© М. Н. Малышева, А. О. Фролов

Из пищеварительной системы клопа-водомерки *Gerris rufoscutellatus* выделен в лабораторную культуру и описан новый вид гоноксенных трипаносоматид — *Wallaceina vicina*. Изучена морфология жгутиконосцев на световом и электронно-микроскопическом уровнях.

История изучения трипаносоматид, паразитирующих в пищеварительной системе клопов-водомерок, насчитывает без малого 100 лет. Впервые трипаносоматиды из этих насекомых были обнаружены в Индии Паттоном в 1907 г. в водомерке *Gerris fossarum* и получили название *Crithidia* (= *Blastocrithidia*) *gerridis* (Patton, 1908). Двумя годами позже Поте описала *Crithidia* (= *Blastocrithidia*) *gerridis* из кишечника *Gerris paludum* в Великобритании (Porter, 1909). Всего к настоящему времени из герриид описано 7 видов жгутиконосцев, относящихся к 3 родам: *Crithidia*, *Leptomonas* и *Blastocrithidia*. Из клопов *Gerris rufoscutellatus* известно только 2 вида жгутиконосцев: *Blastocrithidia gerridis* (Becker, 1923) и *Leptomonas repentinus* (Малышева, Фролов, 2002). В настоящей работе приводится описание нового вида трипаносоматид из пищеварительного тракта водомерок, относящегося к роду *Wallaceina*, ранее не зарегистрированного у представителей сем. Gerridae.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клопы-водомерки *Gerris rufoscutellatus* Latreille, 1807 были собраны в Ленинградской обл. в окрестностях пос. Комарово. Усыпленных хлороформом насекомых вскрывали, после чего фрагменты кишечника помещали в каплю питательной среды и исследовали под микроскопом. В случае обнаружения инвазии из содержимого кишечника делали сухой мазок, а фрагменты кишечника помещали в пробирки с искусственной питательной средой. Сухие мазки фиксировали 96%-ным этанолом и затем окрашивали по Романовскому-Гимза (рН 6.8). Для получения культур жгутиконосцев использовали следующие среды: среда Brain Heart Infusion (BHI) фирмы Difco, среда Грейса (Grace's Insect Cell Culture Medium) для культивирования клеток насекомых фирмы Gibco BRL и смесь этих сред в соотношении 1 : 1. В среды добавляли гемин (25 мкг/мл) и раствор антибиотиков: бензилпеницилли-

на (500 ед/мл) и стрептомицина (500 мкг/мл). Для культивирования трипаносоматид на плотной питательной среде в приготовленную по стандартной методике среду ВНИ добавляли питательный агар фирмы Difco (2 %).

Подсчет численности клеток в культуре проводили в камере Горяева. Светооптические исследования были выполнены на микроскопе Jenoval contrast Jena. Микрофотографии получены с использованием телекамеры CCD и системы видеозахвата Asus V3800. Размеры клеток жгутиконосцев измеряли с использованием программы UTHSCSA Image Toole v. 2.0.

Для исследования в электронном микроскопе культуру жгутиконосцев осаждали центрифугированием (300 об/мин), после чего осадок фиксировали 1.5 %-ным глутаральдегидом на 0.1 М какодилатном буфере (1 ч). Затем клетки промывали в 0.1 М растворе какодилатного буфера, содержащем 5 % сахарозы (3 смены) и постфиксировали 2 %-ным раствором OsO_4 на 0.1 М какодилатном буфере (30 мин). После этого клетки обезвоживали и заключали в смесь аралдита с эпоном. Срезы готовили на ультрамикротоме LKB III, окрашивали водным раствором уранилацетата и цитратом свинца и исследовали в микроскопе Jeol 100C.

РЕЗУЛЬТАТЫ

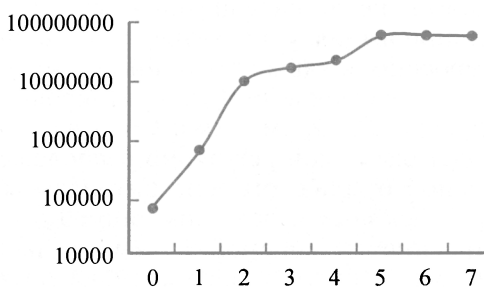
Получение культур жгутиконосцев. При исследовании содержимого кишечника клопов-водомеров (его среднего отдела) на прижизненных препаратах у 2 из 4 вскрытых особей была обнаружена интенсивная инвазия жгутиконосцами *Blastocrithidia gerridis* (Patton, 1908). Из содержимого их кишечника были приготовлены сухие мазки, а фрагменты кишечника одной особи были помещены в пробирки с перечисленными выше питательными средами. Все посевы дали положительный результат. На 4—7 сут на всех типах сред в культуральных пробирках были обнаружены подвижные клетки трипаносоматид. На смеси сред ВНИ и Грейса была получена описанная ранее культура жгутиконосцев *Leptomonas repentinus* Malysheva et Frolov, 2002 (Малышева, Фролов, 2002). В пробирках со средами ВНИ с геминном и Грейса с геминном были обнаружены жгутиконосцы, морфологически идентичные друг другу, но по целому ряду признаков отличающиеся от *Leptomonas repentinus*. После очистки культуры от дрожжеподобных грибов в приборе, разделяющем клетки по подвижности (Подлипаев, Фролов, 1987), культуру вели на среде ВНИ с добавлением гемина. Пересевы проводили 1 раз в месяц. После пересева культуру на 3 сут помещали в термостат при температуре 24 °С, а затем переводили в холодильник (5—6 °С).

При температуре культивирования 24 °С культура на жидкой питательной среде достигает стационарной фазы роста на 5-е сут при максимуме численности 5.8×10^7 кл/мл. График роста культуры представлен на рис. 1.

Рис. 1. График роста культуры *Wallaceina vicina* на жидкой питательной среде.

По оси абсцисс — время культивирования, сут; по оси ординат — концентрация клеток в культуре, кл/мл.

Fig. 1. The diagram of the growth of culture *Wallaceina vicina* on the liquid media.



Морфология клеток в культуре. В культуре жгутиконосцы представлены двумя морфологическими формами: промастиготами и эндомастиготами с характерной петлеобразной укладкой жгута. Форма промастигот достаточно сильно варьирует, но преобладают клетки эллипсоидальной формы — с закругленными задним и передним концами. Также встречаются промастиготы с оттянутым и заостренным задним концом и расширенным тупосрезанным передним концом (клетка при этом имеет почти треугольную форму) (рис. 2, 1, 4, см. вкл.). Такие жгутиконосцы, как правило, образуют пары клеток, соединенные друг с другом передними концами (рис. 2, 1). Длина промастигот 5.1—8.8 мкм, ширина 2—5 мкм. Ядро у промастигот обычно лежит посредине клетки. Кинетопласт расположен перед ядром или несколько сбоку от него. Кинетопласт и ядро тесно сближены, расстояние между ними — 0.1—0.8 мкм. Жгутиковый карман прямой, открывается терминально. Длина свободной части жгутика равна длине клетки или несколько превышает ее, варьируя в пределах от 5.8 до 12.3 мкм. Делящиеся клетки малоподвижны, имеют яйцевидную форму, жгутики их укорочены. В культуре кроме свободноплавающих промастигот постоянно присутствуют их розетковидные ассоциаты (рис. 2, 2). У объединенных в розетки жгутиконосцев тело клетки сильно укорачивается и расширяется, зачастую приобретая шаровидную форму.

2-й тип клеток — это мелкие эндомастиготы. Эндомастиготы имеют овальную форму, задний конец клетки закруглен, передний — несколько оттянут (рис. 2, 3). Ядро округлое лежит посредине клетки или немного смещено к заднему концу. Кинетопласт находится перед ядром, реже сбоку от него. Жгутиковый карман с расположенным в нем жгутиком начинается у кинетопласта, направляется назад, петлеобразно огибает ядро и открывается на переднем конце клетки. Жгутик за пределы жгутикового кармана не выходит. Размеры эндомастигот колеблются от 3.5 до 6.4 мкм в длину и от 1.4 до 3.5 мкм в ширину, длина ядра — 1.2—1.9 мкм.

Рост жгутиконосцев на плотной питательной среде. При клонировании на плотной питательной среде жгутиконосцы формируют колонии. Первые видимые невооруженным глазом колонии (диаметром около 1 мм) появляются на 4-е сут и представлены округлыми мономофными бляшками. Однако уже на 5-е сут выявляется неоднородность колоний: наряду с округлыми можно выявить слаборазветвленные неправильной формы колонии. Разница в строении колоний со временем становится все более определенной. Можно выделить 2 типа колоний, которые формируют на плотной среде *W. vicina*: правильные округлые с мелкими псевдоподиеподобными выростами по краю и амeboидные, или колонии неправильной формы, по краю которых также расположены мелкие выросты (рис. 2, 5, 6). На 10-е сут округлые колонии достигают 5 мм в диам., а амeboидные — 30. Исследование жгутиконосцев в колониях показало, что оба типа колоний образованы промастиготами, не отличающимися друг от друга по морфологии. Эффективность клонирования у *W. vicina* необычайно высокая. Как правило, количество выросших в чашке колоний достигает 90 % от числа высеянных клеток.

Ультратонкое строение. Покровы жгутиконосца представлены тубулеммой (рис. 3, 2, см. вкл.). Снаружи клетка покрыта плазмалеммой, которую подстилает слой регулярно расположенных микротрубочек, лежащих в свободной от рибосом зоне цитоплазмы, расстояние между центрами микротрубочек составляет примерно 60 нм (рис. 3, 1, 2). Жгутик имеет типичное строение с аксонемой 9 + 2 и параксиальным тяжем (рис. 3, 1, 3). В месте выхода из жгутикового кармана внутрижгутиковый матрикс расширяется.

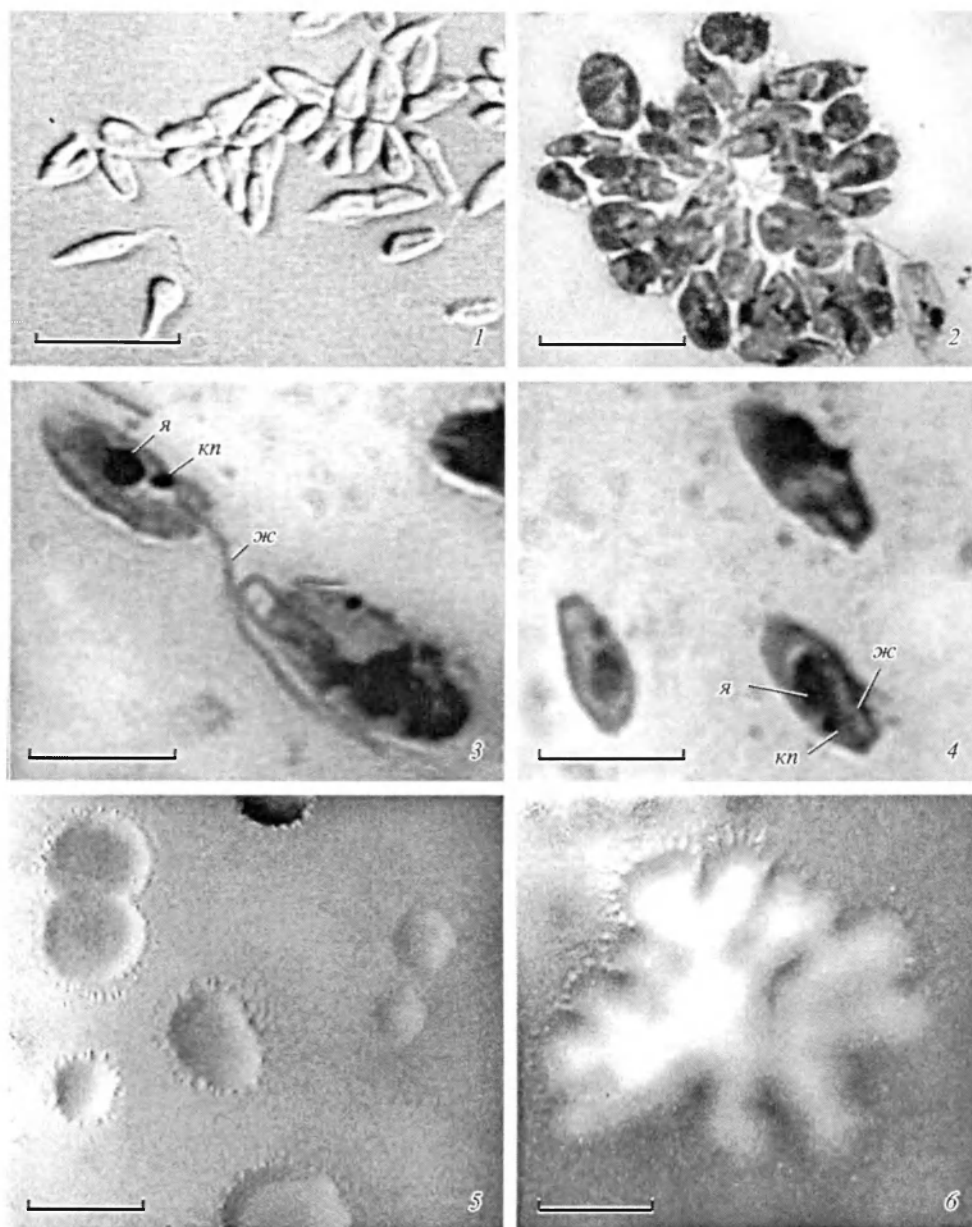


Рис. 2. Строение *Wallaceina vicina* в культуре (световой микроскоп).
1 — общий вид жгутиконосцев в культуре, 2 — розетка жгутиконосцев, 3 — промастиготы, 4 — эндомастиготы, 5 — округлые колонии, 6 — «амебоидная» колония. жс — жгутик, кп — кинетопласт, я — ядро. Масштабные линейки: 1, 2 — 10 мкм; 3, 4 — 5 мкм; 5 — 5 мм; 6 — 10 мм.

Fig. 2. The structure of the flagellates *Wallaceina vicina* in the culture. Light microscope micrograph.

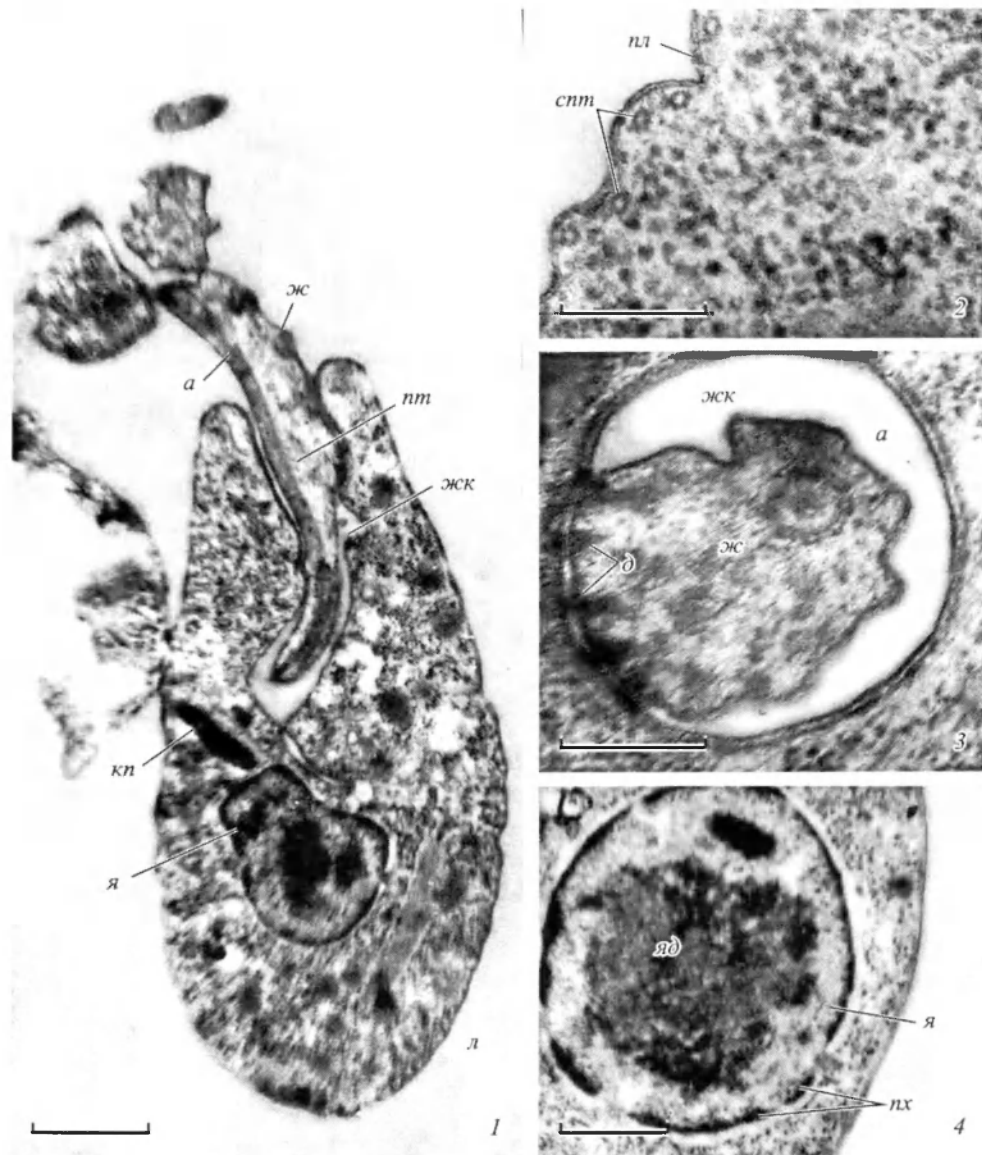


Рис. 3. Ультратонкое строение *Wallaceina vicina*.

1 — продольный срез через промастиготу (общий вид), 2 — строение поверхностных структур, 3 — поперечный срез в области жгутикового кармана, 4 — строение ядра. а — аксонема, д — десмосомы, жк — жгутиковый карман, л — липидные включения, пл — плазматическая мембрана, пт — параксиальный тяж, лх — пристеночный хроматин, спт — субпеликулярные микротрубочки, яд — ядрышко. Остальные обозначения те же, что и на рис. 2. Масштабные линейки, мкм: 1 — 1, 2 — 1.5, 3 — 0.2, 4 — 0.5.

Fig. 3. The ultrastructure of *Wallaceina vicina*.

Между мембранами жгутика и жгутикового кармана формируются хорошо развитые десмосомы (рис. 3, 3). Кинетопласт компактный типичного строения с плотноупакованными нитями ДНК. Ядро имеет хорошо развитое ядрышко, по периферии ядра расположен пристеночный хроматин (рис. 3, 4). Рядом со жгутиковым карманом расположены цистерны комплекса Гольджи. Цитоплазму заполняют многочисленные рибосомы. Липидные включения сосредоточены в основном в задней части клетки (рис. 3, 1).

Наличие в культуре мелких эндомастигот с характерной петлеобразной укладкой жгутика позволяет отнести этих трипаносоматид к роду *Wallaceina*. Поскольку при исследовании сухого мазка, изготовленного из содержимого кишечника хозяина, удалось обнаружить лишь эпимастиготы *Blastocrithidia gerridia* и промастигот *Leptomonas repentinus* (Малышева, Фролов, 2002), то описание нового вида выполнено нами по стадиям развития этих жгутиконосцев в культуре.

Wallaceina vicina Malysheva et Frolov sp. n.

Хозяин: *Gerris rufoscutellatus* Latreille, 1807 (Hemiptera, Gerridae).

Локализация: кишечник.

Место обнаружения: Северо-Запад России, Ленинградская обл., пос. Комарово.

Диагноз. В культуре жгутиконосцы представлены промастиготами и мелкими эндомастиготами с петлеобразно огибающим ядром жгутиковым карманом. Промастиготы обычно эллипсоидальной формы. Ядро округлое, лежит посередине клетки. Свободная часть жгутика равна длине клетки или чуть превышает ее. Кинетопласт лежит перед ядром или сбоку от него, ядро и кинетопласт сближены. Промастиготы 6.9 мкм дл., 3.1 мкм шир., расстояние между ядром и кинетопластом 0.5 мкм, длина свободной части жгута 8.5 мкм. Эндомастиготы 4.9 мкм дл., 2.3 мкм шир., длина ядра 1.5 мкм. Крупные эндомастиготы с прямым жгутиковым карманом не обнаружены. На плотной питательной среде образуют 2 типа колоний: округлые и амeboидные. Оба типа колоний имеют многочисленные мелкие псевдоподиеподобные выросты по краю.

Wallaceina vicina отличается от двух ранее описанных представителей рода *Wallaceina* — *W. inconstans* (Podlipaev et al., 1990) и *W. brevicula* (Frolov et Malysheva, 1989) формой и размерами колоний на плотной питательной среде. Кроме того, *W. vicina* отличается от *W. brevicula* размерными характеристиками: длина промастигот у последних 8.2 (6—11) мкм, ширина 2.9 (1.2—4.1) мкм, длина эндомастигот 5.7 (5.2—6.8) мкм, ширина 2.7 (2.3—3.4) мкм (Малышева, 1998); от *W. inconstans* — отсутствием опистомастигот.

Опыт по высушиванию эндомастигот показал, что в отличие от *W. brevicula* (Фролов, Малышева, 1989) и *W. inconstans* (Фролов, Малышева, 1992), эндомастиготы описываемого здесь вида утрачивают жизнеспособность сразу после высушивания мазка.

ОБСУЖДЕНИЕ

Гомоксенные трипаносоматиды, паразитирующие в клопах-водомерках, отличаются значительным полиморфизмом стадий развития, что существенно затрудняет определение их видовой принадлежности. Кроме того, у геррид, как, впрочем, и у других хищных клопов, довольно широко распростра-

нено явление смешанной инвазии хозяина представителями различных видов и родов трипаносоматид. Так, например, ранее при попытке выделения в культуру *B. gerridis* из различных представителей рода *Gerris* были получены 2 штамма жгутиконосцев из рода *Leptomonas* и 1 из рода *Crithidia* (Wallace et al., 1960). Получение аксеничных культур гомоксенных трипаносоматид значительно облегчает работу по определению видового состава паразитофауны насекомых и открывает широкие возможности для ультраструктурных и молекулярно-генетических исследований. В настоящей работе в пищеварительном тракте одной особи *Gerris rufoscutellatus* была выявлена инвазия одновременно 3 различными видами гомоксенных трипаносоматид: *Blastocrithidia gerridis*, *Leptomonas repentinus* и *Wallaceina vicina*, причем 2 последних вида были описаны впервые именно благодаря полученным аксеничным культурам.

Необходимо отметить, что стадии, напоминающие мелкие эндомастиготы рода *Wallaceina*, были описаны у представителей сем. Gerridae еще Паттоном и Поте (Patton, 1908; Porter, 1909) как стадии развития *Crithidia* (= *Blastocrithidia*) *gerridis*. Позднее Уоллес (Wallace et al., 1960, 1965) показал, что в работах Паттона и Поте разные виды жгутиконосцев были ошибочно определены ими как стадии жизненного цикла *B. gerridis*. Так, Паттон (Patton, 1908) описывает в желудке нимф *Gerris fossarum*, а также у клопов из сем. Veliidae (*Microvelia* sp. и *Peritopos* sp.) безжгутиковые формы этих жгутиконосцев как овальные, округлые или грушевидные тела с размерами 4–6 × 3–4 мкм, с круглым ядром сбоку клетки и палочковидным кинетопластом. Поте (Porter, 1909) в своей статье приводит описание до- и постжгутиковых стадий *Crithidia* (= *Blastocrithidia*) *gerridis* из кишечника *Gerris paludum*, которые представляют собой мелкие, обычно овальные тела 3–7 мкм дл. и 2–4 мкм шир. На рисунках Поте (Porter, 1909) хорошо видно, что некоторые дожгутиковые стадии имеют внутри клетки петлеобразно уложенный жгутик. Таким образом, безжгутиковые формы, описанные Паттоном и Поте (Patton, 1908; Porter, 1909) как стадии развития *Blastocrithidia gerridis*, по форме, размерам и характеру укладки жгутика похожи на эндомастиготы рода *Wallaceina*. Обнаружение этих безжгутиковых форм в разных частях света: Индии (Patton, 1908), Великобритании (Porter, 1909) и России (наши данные) и у разных представителей сем. Gerridae позволяет говорить о неслучайном характере инвазии и включить жгутиконосцев из рода *Wallaceina* в список гомоксенных трипаносоматид, паразитирующих в пищеварительной системе герриид. Ошибочное принятие за эндомастиготы рода *Wallaceina* цист или, точнее, цистоподобных стадий представителей других родов трипаносоматид кажется мало вероятным. Уоллес (Wallace et al., 1965), например, прямо указывает на отсутствие цист у *B. gerridis*, *B. veliae* и *L. costoris* и не упоминает о наличии цист у *C. flexonema* и *L. collosoma* (Wallace et al., 1960). Хотя позднее были описаны цистоподобные стадии у *Blastocrithidia* sp., обнаруженные в задней кишке *Gerris lacustris* (Фролов и др., 1997). Однако их строение существенно отличается от строения эндомастигот: они полностью лишены жгутика. Отличаются цистоподобные стадии бластокридий из водомерок и по форме: «незрелые» амастиготы имеют округлую форму, а полностью сформировавшиеся — палочковидную.

Ранее представители рода *Wallaceina* были описаны только у наземных клопов из семейства Miridae — *W. inconstans* (Подлипаев и др., 1990) и Nabidae — *W. brevicula* (Фролов, Малышева, 1989). Приуроченность описываемого здесь вида жгутиконосцев к сем. Geriidae, ведущему водный образ жизни, по-видимому, также свидетельствует в пользу целесообразности описания нового вида.

Сравнение особенностей роста культур *W. vicina* и *W. brevicula* на жидкой питательной среде обнаруживает очевидные различия между этими видами. *W. brevicula* достигает стационарной фазы роста на 12-е сут при максимальной численности клеток 4.3×10^7 (Малышева, 1998), у *W. vicina*, как было отмечено выше, максимальная численность достигается на 5-е сут и составляет 5.8×10^7 кл/мл.

Отсутствие на препарате из кишечника хозяина промастигот и эндомастигот *W. vicina* можно объяснить тем, что мазок был выполнен из содержимого среднего отдела кишечника. На примере другого представителя рода *Wallaceina* — *W. brevicula* было показано, что все развитие этих жгутиконосцев протекает в ректальном отделе кишечника, а в переднем и среднем отделах кишечника можно обнаружить только единичные клетки (Малышева, Фролов, 1995). Отсутствие эндомастигот с прямым жгутиковым карманом, возможно, связано с утратой этого типа клеток при выделении жгутиконосцев в культуру. Для более точного ответа на этот вопрос требуются дополнительные исследования.

Список литературы

- Малышева М. Н. Жизненный цикл и морфология стадий развития жгутиконосцев *Proteomonas brevicula* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae): Автореф. дис. ... канд. биол. наук. 1998. 18 с.
- Малышева М. Н., Фролов А. О. Цикл развития жгутиконосца *Proteomonas brevicula* (Trypanosomatidae) в хищных клопах семейства Nabidae (Hemiptera) // Паразитология. 1995. Т. 29, вып. 4. С. 289—297.
- Малышева М. Н., Фролов А. О. Описание и лабораторное культивирование *Leptomonas repentinus* sp. n. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) — паразита клопа-водомерки *Gerris rufoscutellatus* // Паразитология. 2002. Т. 36, вып. 4. С. 286—294.
- Подлипаев С. А., Фролов А. О. Описание и лабораторное культивирование *Blastocrithidia miridarum* sp. n. (Mastigophora, Trypanosomatidae) // Паразитология. 1987. Т. 21, вып. 6. С. 545—552.
- Подлипаев С. А., Фролов А. О., Колесников А. А. *Proteomonas inconstans* n. gen., n. sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) — паразит клопа *Calocoris sexguttatus* (Hemiptera: Miridae) // Паразитология. 1990. Т. 24, вып. 4. С. 339—346.
- Фролов А. О., Малышева М. Н. Описание *Crithidia allae* sp. n. и *Crithidia brevicula* sp. n. (Protozoa, Trypanosomatidae) из хищного клопа *Nabis brevis* Scholtz (Hemiptera, Nabidae) // Зоол. журн. 1989. Т. 68, вып. 7. С. 5—10.
- Фролов А. О., Малышева М. Н. Эндомастиготы — особый тип расселительных стадий трипаносоматид рода *Proteomonas* // Паразитология. 1992. Т. 26, вып. 4. С. 351—354.
- Фролов А. О., Малышева М. Н., Подлипаев С. А. Необычный способ формирования цистоподобных стадий у *Blastocrithidia* sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), паразитирующих в кишечном тракте клопов-водомеров (Hemiptera: Gerridae) // Паразитология. 1997. Т. 31, вып. 4. С. 356—363.
- Becker E. R. Observation on the morphology and life cycle of *Crithidia gerridis* patton in the water-strider, *Gerris remigis* Say // Journ. Parasitol. 1923. Vol. 9. P. 141—152.
- Patton W. S. The life cycle a species of *Crithidia* parasitic in the intestinal tract of *Gerris fos-sarum* Fabr // Ar. Protistenk. 1908. Bd 12. S. 131—146.
- Porter A. The morphology and life-history of *Crithidia gerridis*, as found in the british water-bug, *Gerris paludum* // Parasitology. 1909. Vol. 2. P. 348—366.
- Wallace F. G., Clark T. B., Dyer M. I., Collins T. Two new species of flagellates cultivated from insects of the genus *Gerris* // Journ. Protozool. 1960. Vol. 7. P. 390—392.
- Wallace F. G., Todd S. R., Rogers W. Flagellate parasites of water streiders with a description of *Leptomonas costoris*, n. sp. // Journ. Protozool. 1965. Vol. 12, N 3. P. 390—393.

Зоологический институт РАН,
Санкт-Петербург

Поступила 12 XII 2003

THE DESCRIPTION OF WALLACEINA VICINA SP. N.
(KINETOPLASTIDA: TRYPANOSOMATIDAE),
FROM THE WATER STRIDER GERRIS RUFOSCUTELLATUS LATREILLE, 1807,
(HEMIPTERA: GERRIDAE)

M. N. Malysheva, A. O. Frolov

Key words: *Wallaceina*, Trypanosomatidae, Gerridae, culture, ultrastucture.

SUMMARY

A new homoxenos trypanosomatidae, *Wallaceina vicina* sp. n., is described from the digestion tract of the water strider *Gerris rufoscutellatus*. The laboratory culture of *W. vicina* has been obtained. Flagelated have been studied with TEM.
